

✦ Artículo de revisión

Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a escala piloto, una revisión

Paula A. Payán Quintero^{1*}

1. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, COL

*Correspondencia: paula_payan@javeriana.edu.co

Palabras clave: polihidroxialcanoatos, (PHA), escala piloto, microorganismos, cultivo puro, cultivo mixto.

Resumen

Dado el incremento exponencial en la producción mundial de plásticos y el impacto ambiental que estos están causando por su desacertada disposición, es apremiante explorar opciones ecoamigables. Los polihidroxialcanoatos (PHA) son un tipo de bioplástico de origen microbiano termoestable que pueden adoptar diferentes formas estructurales, representando una alternativa potencial frente a los polímeros derivados del petróleo. Dado que su producción se da por medio de microorganismos, tanto investigadores como industrias están a la vanguardia de encontrar combinaciones de sustratos y condiciones que optimicen y potencialicen su producción. Se encontró que los residuos tanto físicos como líquidos podrían representar un potencial sustrato como fuente de carbono, además de reintegrar desechos a una nueva cadena de producción. Dentro de los posibles tipos de cultivos se destacan los mixtos al presentar importantes resultados y ser menos exigentes en las condiciones de desarrollo. Pese a que los cultivos puros pueden presentar mayores tasas de síntesis de PHA, estas resultan más costosas. Se han explorado diferentes tipos de sustratos como papel de oficina, hidrolizado de madera, aceite de origen vegetal como jatrofa, suero de queso, entre otros. Así mismo se han explorado tipos de bacterias, arqueas, hongos y microalgas para la producción de PHA.

Introducción

Dado el incremento exponencial en la producción mundial de plásticos, cuyo pronóstico para el año 2030 estima una generación superior a 600 millones de toneladas de plásticos derivados del petróleo o tradicionales (1), y considerando el impacto ambiental causado por su inadecuada disposición y bajo nivel de reciclaje, resulta apremiante explorar alternativas eco amigables. Los plásticos provenientes de la industria petroquímica presentan tiempos de descomposición estimados entre 100 y 1000 años, lo que representa una amenaza para la fauna y flora de los distintos ecosistemas afectados por la actividad antropogénica irresponsable.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son un tipo de bioplástico de origen microbiano, termoestable y capaz de adoptar diversas estructuras. Representan una alternativa potencial a los polímeros derivados del petróleo, ya que pueden producirse a partir de fuentes de carbono renovables y son 100 % biodegradables (2). Además, han sido ampliamente utilizados en campos terapéuticos, procesos de envasado y rehabilitación ambiental (3). Sin embargo, su principal limitación continúa siendo el costo de producción (2 a 5 euros/kg) (2), que sigue siendo superior al de los plásticos tradicionales, y solo sería competitivo si los precios del petróleo superaran los 100 a 120 dólares por barril (1).

El sector industrial, en su búsqueda constante por optimizar procesos y aumentar rentabilidad, ha comenzado a reconocer la importancia de minimizar el impacto ambiental de sus operaciones, especialmente sobre el aire y los cuerpos de agua. Este reconocimiento ha motivado a que múltiples empresas e instituciones centren sus investigaciones y recursos en profundizar el conocimiento sobre la producción de PHA, particularmente en la optimización de los procesos de fermentación. Por tanto, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la literatura de los últimos 10 años, recopilando las estrategias empleadas a nivel mundial para optimizar la producción de estos biopolímeros a escala piloto.

La producción masiva de plásticos surgió en los años cincuenta y aumentó exponencialmente en las décadas posteriores (4). Desde entonces, se han generado aproximadamente 6300 Mt de residuos plásticos, de los cuales solo un 9 % se recicla, un 12 % se incinera y un 79 % termina en vertederos o ecosistemas naturales, donde se acumulan de manera persistente (5). Se estima que estos residuos han afectado a más de 690 especies marinas, mediante partículas microscópicas que ingresan al tracto digestivo de organismos de distintos niveles tróficos (5), generando un efecto cascada que incide negativamente en múltiples niveles ecológicos y, en casos extremos, contribuye a la pérdida de ecosistemas completos.

Entre los avances en investigación celular se encuentran los polímeros polihidroxialcanoatos (PHA), poliésteres macromoleculares producidos por microorganismos como bacterias, arqueas, hongos y algas, ya sea mediante la acumulación de materiales extracelulares, como los exopolisacáridos (6), y/o por fermentación de diversas fuentes de carbono (7). Estos compuestos funcionan principalmente como reserva de energía y carbono durante condiciones de estrés nutricional, sin afectar la presión osmótica celular. En los últimos años se han identificado otras funciones biológicas, como la protección frente a disolventes tóxicos, estrés oxidativo, elevadas temperaturas, hipersalinidad, congelación e irradiación UV (8). La Figura 1 muestra la composición de un gránulo intracelular de PHA, el cual se encuentra en el

citoplasma microbiano en forma de polímeros líquidos, móviles y amorfos, rodeados por una monocapa de fosfolípidos.

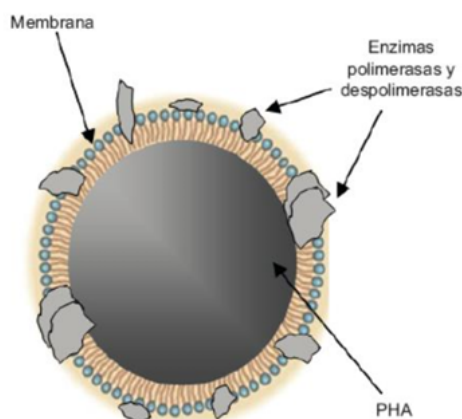


Figura 1. Esquema del gránulo de PHA intracelularmente, tomado de (2)

Los PHA constituyen un material innovador con gran potencial para sustituir plásticos derivados del petróleo debido a sus propiedades biodegradables y termoplásticas. Además, son biocompatibles y no tóxicos, lo que facilita su implementación en una amplia gama de aplicaciones (9). La composición de los PHA depende del microorganismo productor y de la naturaleza de la fuente de carbono, permitiendo formular nuevos polímeros con propiedades fisicoquímicas específicas (10). Un ejemplo es el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hexanoato) (PHBHHx), un polímero biocompatible y biorreabsorbible ampliamente utilizado como andamio celular en ingeniería de tejidos (11).

No obstante, su rendimiento productivo sigue siendo inferior al de los plásticos tradicionales, y su proceso es costoso debido al uso de cultivos bacterianos puros que requieren condiciones completamente estériles, fuentes de carbono de elevado costo (que constituyen cerca del 40 % del costo total de producción) y procesos complejos de extracción y purificación del PHA final (7). A lo anterior se suman las exigencias de las condiciones de cultivo y los procesos de fermentación por lotes, lotes alimentados o repetidos (10).

Para su producción a nivel piloto o industrial, es fundamental considerar que la acumulación de PHA ocurre, en la mayoría de los casos, bajo condiciones de limitación de nutrientes como N, P, S, Mg u oxígeno (2), como ocurre en los organismos acumuladores de fósforo y glucógeno impulsados por condiciones limitantes de receptores de electrones (7). En la Tabla 1 se presentan algunos de los microorganismos empleados en la producción de PHA y el nutriente cuya limitación estimula su síntesis.

Tabla 1. Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción.

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas</i> sp. K.	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium</i> ORS571	Oxígeno
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>	Fósforo

Tomada de (2).

El PHA más estudiado es el P3HB, producido por la bacteria *Ralstonia eutropha*, cuya ruta de biosíntesis a partir de carbohidratos ha sido descrita en detalle. En general, el proceso metabólico inicia con acetil-CoA y continúa mediante una secuencia de tres reacciones catalizadas por las enzimas 3-cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y poli(3-hidroxibutirato) sintetasa (2), como se muestra en la Figura 2.

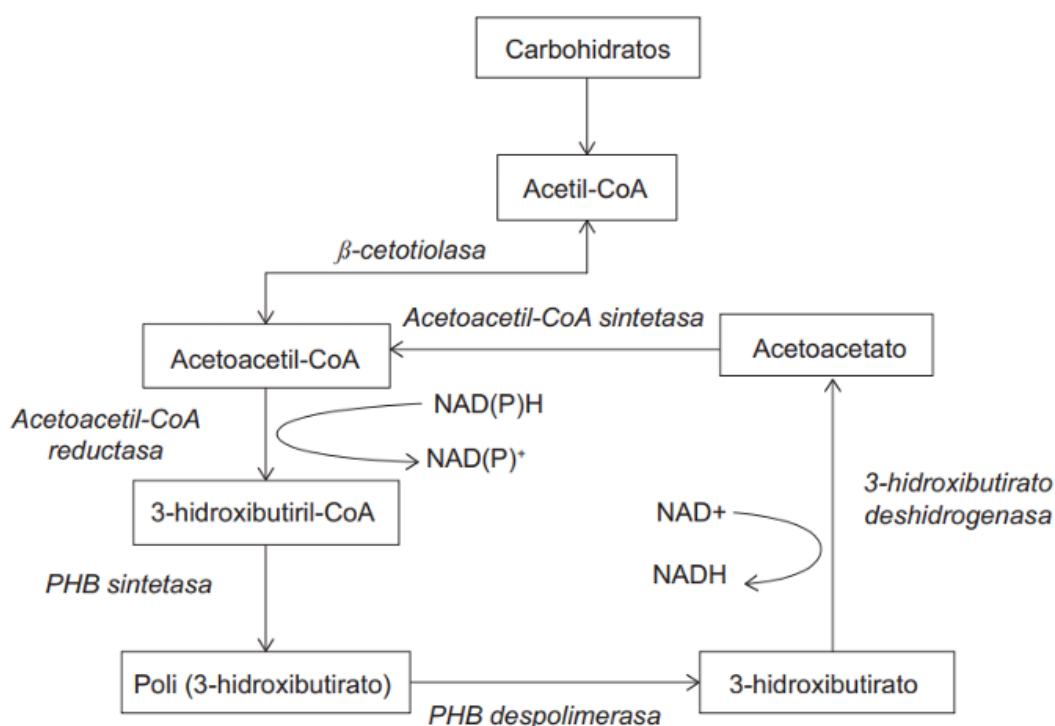


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis y degradación de P3HB a partir de carbohidratos, tomada de (2).

En este contexto, el propósito de este trabajo es compilar los resultados más relevantes publicados en estudios experimentales a nivel mundial, enfocados en la producción de PHA a escala piloto, y proponer posibles combinaciones entre sustratos y microorganismos que contribuyan a potenciar este proceso.

Metodología

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos en línea Scopus y Web of Science, utilizando los términos expuestos en la Tabla 1 y los operadores booleanos AND, OR y NOT. Los filtros se ajustaron en cada base de datos para garantizar que la búsqueda se desarrollara dentro de los parámetros establecidos.

Con base en el número de artículos encontrados en cada plataforma y durante los meses de marzo y abril de 2022, se elaboró un diagrama PRISMA que integró los resultados obtenidos en ambas bases y para cada combinación de búsqueda utilizada, con el propósito de documentar de manera transparente y ordenada la información recopilada.

- Criterios de inclusión: idioma (español e inglés), acceso (libre), año de publicación (2012–2022, ambos incluidos), tipo de documento (artículo, revisión y capítulo de libro) y estado de publicación (final).
- Criterios de exclusión: literatura gris, documentos en idiomas distintos al español e inglés, tipo de documento (actas de conferencia, libros y encuestas breves) y estado de publicación (en revisión).

Tabla 2. Términos que integran los diferentes códigos de búsqueda

Término	AND	AND /OR
polihidroxialcanoatos / polyhydroxyalkanoates	Producción / production	Condiciones / conditions
PHA	Producción industrial /industrial production	Producción a escala piloto/pilot scale production
PHB	Condiciones de producción / production conditions	

Parte de los códigos de búsqueda empleados fueron los siguientes:

Scopus:

- TITLE-ABS-KEY (polyhydroxyalkanoates AND pilot AND scale AND production) AND (LIMIT-TO (OA , "all")) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2022 – 2012))
- TITLE-ABS-KEY (pha AND production) AND (LIMIT-TO (PUBSTAGE , "final")) AND (LIMIT-TO (OA , "all")) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE , "re")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English") OR LIMIT-TO (LANGUAGE , "Spanish"))

Web of Science:

- Polyhydroxyalkanoates (All Fields) AND pilot scale production (All Fields) AND 2009 OR 2008 (Exclude – Publication Years)
- Polyhydroxyalkanoates (All Fields) AND production conditions (All Fields) AND 2011 OR 2010 OR 2009 OR 2008 OR 2007 OR 2006 OR 2005 OR 2004 OR 2003 OR 2002 OR 2001 (Exclude – Publication Years) AND Articles OR Review Articles OR Proceedings Papers (Document Types) AND Review Articles (Document Types) AND Open Access AND Highly Cited Papers

Una vez obtenidos los resultados en cada base de datos, se procedió a descargar las referencias en formato RIS y/o PubMed. Posteriormente, se importaron en la plataforma RefWorks y, mediante la herramienta "Encontrar duplicados", se identificaron y eliminaron los documentos repetidos entre ambas bases.

Resultados

Con el fin de establecer parámetros claros de evaluación para la información recopilada, se decidió considerar los criterios presentados en la Figura 3. Estos incluyen: el tipo de cultivo utilizado (puro o mixto); el tipo de sustrato empleado, definido también como la fuente de carbono, el rendimiento o cantidad total de producto reportado; y el procesamiento posterior (downstream) del bioproceso de producción, donde se incluyen los métodos específicos de extracción y purificación de los PHA.

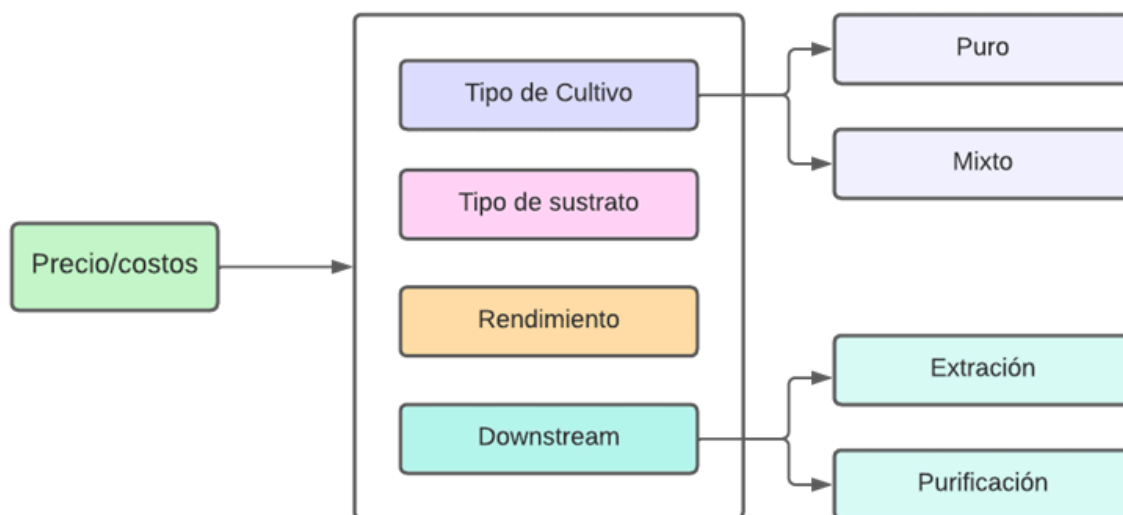


Figura 3. Criterios de comparación entre la información reportada

La Figura 4 muestra la cantidad de información potencialmente útil identificada para la realización de este trabajo. Del total de documentos encontrados (N), sólo se seleccionaron 50 artículos. En términos generales, se observa una cantidad considerable de información proveniente de las dos bases de datos analizadas. En los recuadros laterales de la figura se presentan los criterios de inclusión y exclusión aplicados.

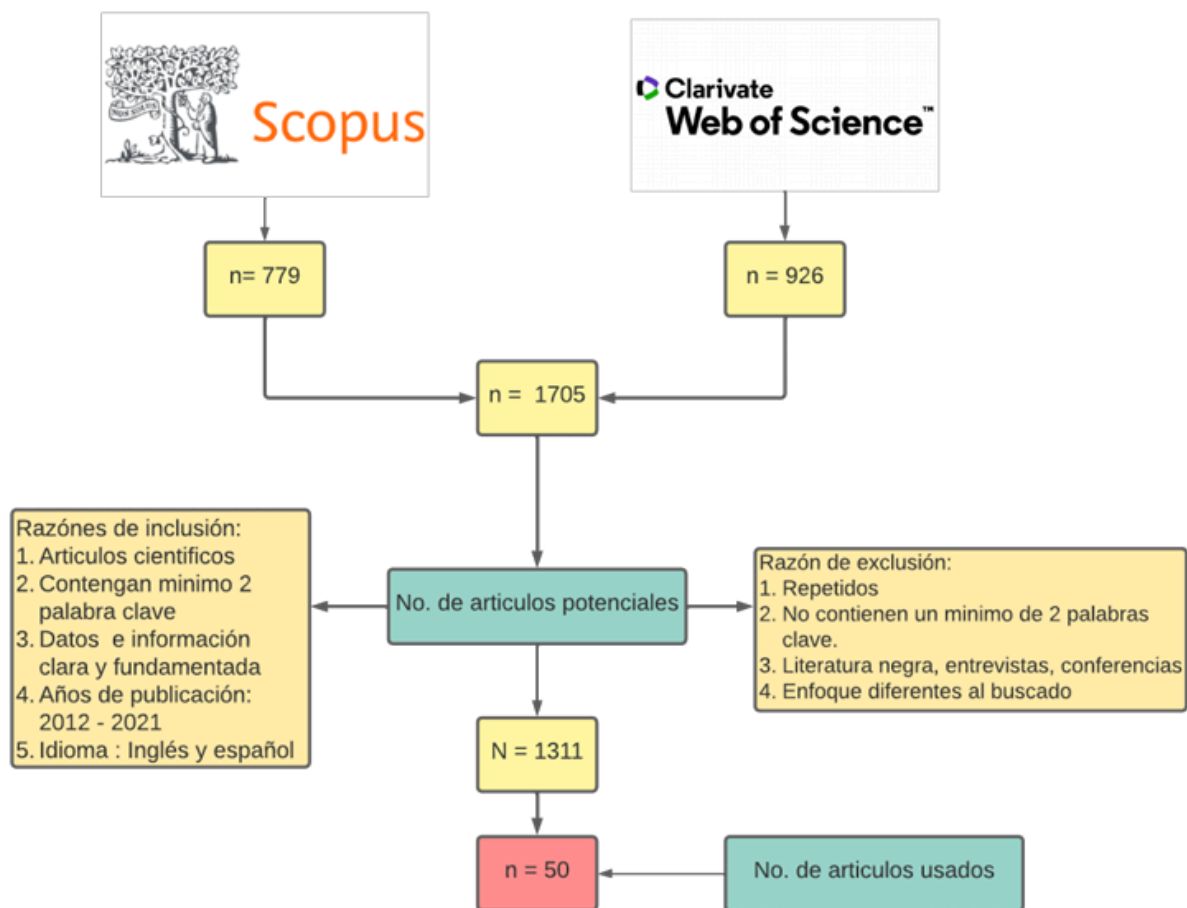


Figura 4. Diagrama Prisma de los resultados de búsqueda

Tabla 3. Microorganismos, sustratos y resultados reportados en los artículos revisados

Microorganismo	Sustrato	Resultado / Productividad	Año	Referencia
Cultivo mixto	Residuos de frutas fermentadas	$4.6 \pm 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	2021	(4)
<i>Cupriavidus necator</i>	Papel de oficina	4.27 g/L	2022	(12)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Aceite de jatrofa	20.1 g/L	2014	(13)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ácido oleico, ácido láurico, gluconato, aceite de coco, palmiste crudo	—	2021	(14)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sucrosa	—	2021	(14)
<i>Pseudomonas putida</i>	Ácido oleico, glucosa, ácido octanoico	—	2021	(14)
<i>Ralstonia eutropha</i> / <i>Cupriavidus necator</i>	—	—	2021	(14)
<i>Paraburkholderia sacchari</i> IPT 101 LMG 19450	Hidrolizado de madera de biorrefinería forestal	—	2020	(15)

<i>Paraburkholderia sacchari</i> IPT 101 LMG 19450	Suero de queso	—	—	(16)
<i>Pseudomonas putida</i> SS9	Suero de queso	5.98 g/L	2020	(17)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Suero agotado de ricotta	1.18 g/L	2020	(18)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Fermentado de molino de aceite de palma	0.048–0.072 g·L ⁻¹ ·d ⁻¹	2021	(19)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> U7	Acetato	1.57 g·L ⁻¹ ·d ⁻¹	2021	(19)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Mezcla de vinazas y melazas	—	2019	(20)
<i>Bacillus subtilis</i>	Melaza de caña	18.9 g/L	2014	(10)
<i>Escherichia coli</i>	Melaza de caña	9.62 g/L	2014	(10)
Cultivo mixto	Glicerol crudo	0.10 g/g	2011	(21)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	—	533.4 mg/L·h; Productividad: 25.4 mg/L; 0.254 g/L	2013	(22)
<i>Synechocystis</i> sp.	—	263 mg/L (0.263 g/L)	2018	(23)
<i>Bacillus cereus</i> EGU3	Glucosa	0.5 g/L	2008	(24)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Ácido valérico	26.6 g/L	1994	(25)
<i>Alcaligenes</i> sp.	Melaza de caña y urea	8.8 ± 0.4 g/L	2013	(26)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Aguas residuales de almazara	0.2 g/L	2017	(27)
Cultivo mixto	Aguas residuales municipales, acetato, glucosa y extracto de carne	—	2015	(28)
Cianobacterias	Aguas residuales	—	2020	(29)
Cultivo mixto	Aguas residuales de cervecería	—	2016	(30)
Cultivo mixto	Aguas residuales lácteas acidificadas y residuos alimentarios orgánicos	—	2021	(31)
Cultivo mixto (géneros: <i>Azoarcus</i> , <i>Comamonas</i>)	Aguas residuales de cocción de mejillones	—	2020	(32)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrolizado de extracto de madera	16.8 g/L	2014	(33)

Discusión

Tipo de cultivo y organismos

En la Figura 5 se observa que, del total de artículos revisados, el 54.5 % empleó cultivos axénicos, mientras que el 45.5 % evaluó la producción de PHA mediante cultivos mixtos.



Figura 5. Tipo de cultivo.

A partir de la Figura 6, se aprecia que las bacterias constituyen el grupo de microorganismos más utilizado para la producción de PHA, seguidas por hongos y arqueas.

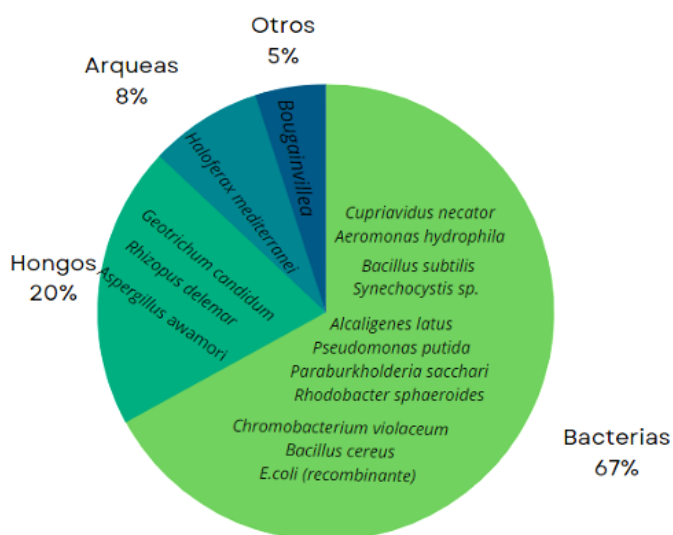


Figura 6. Organismos usados para producción de PHA.

El primer tipo de cultivo identificado es el cultivo puro o axénico. En este tipo de cultivo se utiliza únicamente una especie de microorganismo. Aunque estos procesos de fermentación producen elevados contenidos de PHA, el polímero resultante sigue siendo entre cuatro y nueve veces más costoso que los plásticos tradicionales (34). Para el año 2015, el precio promedio de los plásticos derivados del petróleo rondaba 1 USD/kg, mientras que el PHB se ubicaba alrededor de 5 USD/kg.

Una alternativa cada vez más atractiva frente a los cultivos puros es el uso de aguas residuales como sustrato, lo cual elimina la necesidad de condiciones de esterilidad, reduce costos y, de manera simultánea, contribuye a disminuir el impacto ambiental de estos residuos al reincorporarlos en la cadena productiva (34). Entre los microorganismos más utilizados en este tipo de procesos se destaca *Cupriavidus necator* (antes *Ralstonia eutropha*) (13,35), una bacteria oxidante de hidrógeno capaz de crecer en la interfaz de ambientes anaerobios y aerobios. Este microorganismo fue el primero empleado para la producción industrial de PHA en 1990, alcanzando una densidad celular superior a $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con más del 80 % de PHB en un fermentador de 1 m^3 después de 60 horas de fermentación (36). Es además, el microorganismo más empleado debido a su capacidad de acumular hasta un 96 % del polímero en peso seco utilizando diversas fuentes de carbono, incluidos residuos agroindustriales y fuentes lignocelulósicas (37). No obstante, su producción comercial presenta como principal limitación el elevado costo asociado a la recuperación del PHA a partir del citoplasma bacteriano (38).

Aunque *C. necator* es el organismo más citado, se ha reportado que el primer microorganismo descrito como productor de PHA fue *Bacillus megaterium*, cuyo sistema de PHA sintasa presenta características distintas a las de otros productores (8).

Una propuesta innovadora para reducir costos consiste en el uso de cultivos microbianos mixtos (MMC), los cuales suelen operarse en tres etapas: (1) fermentación de la fuente de carbono para generar productos solubles precursores de PHA, (2) selección aeróbica de una comunidad microbiana enriquecida en bacterias acumuladoras de PHA y (3) producción del polímero bajo condiciones de limitación de crecimiento para maximizar la acumulación intracelular (4). Este enfoque, especialmente cuando utiliza residuos y subproductos industriales como sustratos, ha cobrado interés gracias a su potencial para reducir los costos de producción (16). Entre sus ventajas se destacan una menor exigencia en esterilización, reducción de costos del sustrato y la posibilidad de utilizar materias primas complejas (28).

Las bacterias halófilas representan otro grupo de interés para la producción de PHA. Estas son capaces de crecer en concentraciones de NaCl entre 25 y $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y pueden metabolizar sustratos de bajo costo (8). Su tolerancia a altas concentraciones de sal, pH elevado y temperaturas superiores permite realizar procesos fermentativos en condiciones no estériles y continuas, reduciendo aún más los costos operacionales (39).

También se han estudiado consorcios microbianos con alta capacidad de acumulación de PHA, como los dominados por *Clostridium* (29 %), *Pseudomonas* (8 %) y *Rhodopseudomonas* (5 %) en cultivos fotoheterótrofos obtenidos a partir de una columna de Winogradsky (7). Las diferencias entre sus rutas metabólicas pueden resultar en sinergias beneficiosas para la producción.

El uso de bacterias fototróficas púrpuras ofrece otra alternativa. Estos organismos son altamente versátiles, con un metabolismo adaptable a diversos entornos, incluidos flujos complejos de residuos. Una parte clave de esta adaptabilidad radica en su capacidad de acumular PHA en condiciones de estrés (19).

En cuanto a las cianobacterias fotoautotróficas, se ha documentado que diversas especies acumulan gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato como reserva energética y de carbono bajo condiciones adversas (40). Un ejemplo representativo es *Synechocystis sp.*, una

cianobacteria unicelular de agua dulce capaz de crecer fototróficamente durante el día por fotosíntesis oxigénica y heterotróficamente durante la noche mediante glucólisis y fosforilación oxidativa (41).

En el grupo de las arqueas destaca *Haloferax mediterranei*. Aunque menos estudiada que las bacterias (2,27), presenta ventajas importantes: su extrema resistencia a la contaminación gracias a la necesidad de altas concentraciones de sal (2–5 M NaCl), que inhiben el crecimiento de la mayoría de otros microorganismos, y la facilidad para recuperar el PHA mediante choque hipoosmótico tras reducir la salinidad del medio (27,42).

El uso de organismos genéticamente modificados también ha adquirido relevancia. Por ejemplo, Yield10 Bioscience desarrolló en 2021 plantas de camelina capaces de acumular PHA en semillas, abriendo la posibilidad de producir bioplásticos a escala agrícola con costos similares a los aceites vegetales convencionales (43).

De manera similar, el uso de sistemas recombinantes bacterianos ha permitido mejorar la acumulación del polímero. En 2015 se diseñó una cepa recombinante de *E. coli* con capacidad incrementada para producir PHB (44).

Finalmente, a la hora de seleccionar el tipo de cultivo, es importante considerar que los cultivos puros presentan un riesgo elevado de contaminaciones bacterianas o fúngicas. Además, los procedimientos de esterilización necesarios para prevenir estos eventos son costosos y complejos, lo que incrementa el costo final del biopolímero (36).

Tipo de sustrato

El tipo de sustrato o fuente de carbono es igual de importante que el tipo de cultivo y el microorganismo, ya que de este dependerá el rendimiento del proceso, la calidad del producto y el costo total de producción. Por esta última razón, diferentes residuos industriales han sido evaluados como sustratos para la producción de PHA, en lugar de emplear materias primas vírgenes (Figura 7).

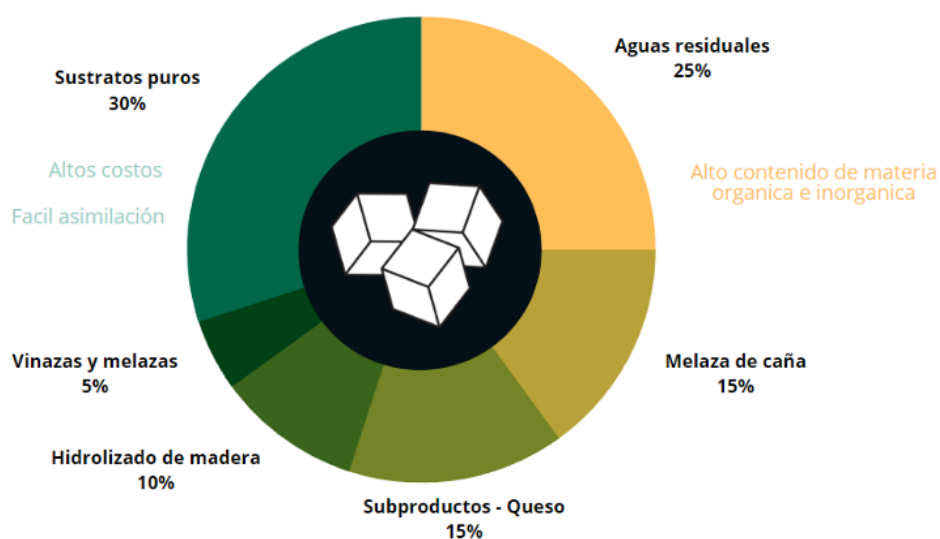


Figura 7. Tipos de sustratos para producción de PHA.

Los flujos de residuos de distintas industrias pueden utilizarse tanto como fuentes de carbono como de inóculo microbiano en los sistemas de producción de PHA. Entre estos residuos se encuentran las aguas residuales de plantas municipales o industriales (7), un enfoque especialmente atractivo para reincorporar un desecho a una nueva cadena de producción, minimizando así el impacto ambiental que generan en los ecosistemas o cuerpos de agua donde son vertidos.

Entre los residuos probados como sustratos para la producción de PHA se encuentran los bioaceites, compuestos por alcoholes, furanos, derivados de benceno, aldehídos y azúcares (45). Estos se obtienen a partir de biomasa y se consideran combustibles de baja calidad que no pueden utilizarse en motores convencionales. Según un estudio realizado en 2014 (46), a partir de estos aceites se obtienen rendimientos de polímeros por sustrato similares o superiores a los conseguidos con acetato, aunque con un menor contenido de PHA. En un proceso de digestión anaerobia, el bioaceite fermentado podría emplearse directamente en la etapa de enriquecimiento de cultivos mixtos, aumentando la presión selectiva hacia microorganismos acumuladores de PHA (46).

Otro tipo de residuo de interés es el suero de queso y el suero agotado de ricota, subproductos de la industria láctea. Solo el 50 % de su producción global se destina a la elaboración de productos alimenticios para humanos o animales. El excedente restante representa un problema ambiental debido a su elevada carga contaminante (47). Del proceso de recuperación de proteínas del suero se obtiene aproximadamente el 81 % de la lactosa originalmente presente en la leche, que ha demostrado ser una fuente de carbono adecuada para la producción de PHA mediante cultivos puros (16). Si se selecciona una MMC eficiente que acumule PHA y sea capaz de utilizar las proteínas como fuente de nutrientes, los costos operativos del proceso podrían reducirse considerablemente, ya que la suplementación externa de nutrientes se eliminaría o disminuiría.

El suero agotado de ricota fue empleado como sustrato en un estudio con *Pseudomonas putida* SS9 (19), dada su elevada concentración de nutrientes fermentables como lactosa, lípidos, proteínas solubles, ácido cítrico y vitaminas del grupo B. Estas características lo convierten en un sustrato confiable para la producción económica de PHA a gran escala (17).

En 2022 se desarrolló un estudio cuyo objetivo fue producir PHB utilizando papel de oficina como sustrato mediante *Cupriavidus necator*, empleando un enfoque de sacarificación y fermentación simultánea por lotes y alimentación por pulsos. Este tipo de operación ha sido repetido con otros sustratos como se evidencia en la Tabla 4, donde se observa que el valor de productividad más alto reportado corresponde a *Cupriavidus necator* utilizando salvado de trigo como sustrato.

Tabla 4. Peso seco de las células (CDW) y rendimiento de PHB de *C. necator* y *Burkholderia* sp. utilizando varias biomásas lignocelulósicas (LCB) a través del modo SHF y SSF.

PHB producer	LCB	Operation mode	CDW (g/l)	PHB (%)	PHB (g/l)	Yield (P/S)	Ref.
<i>C. necator</i>	Sugarcane Bagasse	SHF, Batch	6.0	65	3.9	ND	
<i>C. necator</i>	Water hyacinth	SHF, Batch	12.0	58	7.0	0.24	
<i>C. necator</i>	Sunflower	SHF, Batch	10.9	73	7.8	0.40	
<i>C. necator</i>	Wheat bran	SHF, Batch	24.5	63	14.8	0.32	
<i>C. necator</i>	Sargassum	SHF, Batch	5.3	74	3.9	0.47	
<i>B. sacchari</i>	Waste OP	SHF, Flask, Batch	3.6	44	1.6	0.15	
<i>C. necator</i>	Waste OP	SHF, Flask, Batch	7.7	57	4.5	0.21	
<i>C. necator</i>	wheat straw	SHF, Flask, Batch	12.2	58	7.1	0.13	
<i>C. necator</i>	wheat straw	SSF, Flask, Batch	15.3	65	10.0	0.16	
<i>C. necator</i>	Waste OP	SSF, Flask, Batch	ND	ND	4.27	ND	This study
		SSF, Flask, Fed-batch	ND	ND	4.19	ND	This study

*ND: Not Defined, *SHF: separate hydrolysis and fermentation, *SSF: simultaneous saccharification and fermentation

Tomada de: (12)

Otro desecho clave es la mezcla de vinazas y melazas, o las melazas por separado, subproductos derivados de la caña de azúcar obtenidos durante los procesos de fermentación y destilación de materias primas. Las vinazas, en particular, constituyen el principal residuo orgánico generado en la producción de alcohol. La industria del bioetanol a base de caña de azúcar produce entre 10 y 15 litros de vinaza por cada litro de etanol (20), y su liberación a los cuerpos naturales de agua o al suelo puede ocasionar contaminación debido a su elevado contenido orgánico, mineral y de elementos esenciales para las plantas, además de su carácter altamente corrosivo por su pH ácido. En un estudio se evaluó la producción de PHA por *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, aislados de muestras de suelo contaminado, utilizando melaza de caña como sustrato (10,48).

Por último, se encuentra el glicerol crudo (GC), un subproducto de la producción de biodiésel. Este es un sustrato orgánico rico en carbono con gran potencial como materia prima para la producción de PHA. Considerando su aplicación a gran escala, se ha estimado que una planta de biodiésel con una capacidad de 38 millones de litros (10 millones de galones) por año podría producir, mediante el uso de consorcios mixtos, hasta 19 toneladas métricas de PHB anuales (21).

El tipo de sustrato se presenta como uno de los parámetros de mayor relevancia, dado que tiene una relación directa con la producción de PHA. El uso de fuentes de carbono puras puede aumentar considerablemente los costos; por ello, un enfoque atractivo consiste en emplear residuos orgánicos y aguas residuales derivados de la actividad antropogénica. Esto no solo significa una reducción importante en los costos de producción, sino que además contribuye al manejo adecuado de residuos, una de las problemáticas ambientales más urgentes a nivel global (47,48).

En este sentido, se han utilizado diversos residuos como sustratos: papel de oficina triturado (12), hidrolizado de madera procedente de una biorrefinería forestal (15), melaza de caña (10), mezclas de vinazas y melazas (20), y residuos de frutas fermentadas (4). Es importante tener en cuenta que, según el tipo de sustrato, puede presentarse carencia de ciertos nutrientes esenciales para el microorganismo, mientras que otros pueden encontrarse en exceso. Esto obliga a considerar la suplementación nutricional adecuada para optimizar el proceso.

Rendimiento

Entendiendo el rendimiento como la cantidad de producto obtenido bajo condiciones reales por unidad de tiempo, dentro de los resultados analizados destacan estudios como el realizado con *A. hydrophila*, empleada para la producción a gran escala de PHBHHx en un fermentador de 20.000 L. En dicho estudio, la cepa alcanzó en 46 horas una concentración celular final de 50 g L⁻¹, un peso seco de PHBHHx de 25 g L⁻¹ y un contenido de PHA equivalente al 50 %. Si bien estos valores son representativos, siguen siendo inferiores a los obtenidos con *R. eutropha*, considerada una de las especies más eficientes en la producción de PHA.

Por su parte, consorcios microbianos integrados por *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Rhodopseudomonas* presentan una capacidad máxima de almacenamiento de PHA del 44 % respecto al peso celular seco, lo que equivale aproximadamente a 320 mg de PHA por cada 800 mg de biomasa por litro (7).

Dentro de los valores reportados, los datos más bajos de producción corresponden a *Rhodobacter sphaeroides* RV alimentada con fermentado de aceite de palma, con rendimientos cercanos a 1 g L⁻¹ d⁻¹. En contraste, uno de los valores más altos se registró en *Bacillus subtilis*, alimentada con melaza de caña, alcanzando un máximo de 18.9 g L⁻¹ (10). Le sigue *Escherichia coli*, también cultivada con melaza de caña, con un rendimiento máximo de 9.62 g L⁻¹ (10).

Procesamiento posterior (Downstream)

En cuanto a las estrategias empleadas para la recuperación del polímero, el método más utilizado continúa siendo el uso de disolventes orgánicos, como cloroformo y etanol. Este enfoque es ampliamente adoptado debido a su alta eficiencia de extracción. Le sigue, con un 42 %, la digestión, la cual puede llevarse a cabo mediante procedimientos enzimáticos o químicos, dependiendo del microorganismo y del tipo de matriz celular.

Finalmente, se emplea el método de flotación, un proceso de separación sólido-líquido o líquido-líquido basado en la diferencia de densidades. Este método es aplicable cuando las partículas a separar presentan una densidad menor que la del líquido en el cual se encuentran suspendidas.

Según el tipo de microorganismo empleado, se determina la técnica de lisis y el método de filtración-purificación para la obtención de PHA, siendo este uno de los procesos más demandantes del bioproceso completo. Se sabe, además, que el procesamiento posterior contribuye al costo total de producción debido a la alta acumulación intracelular de PHA y al rendimiento relativamente bajo del producto recuperado. Por lo tanto, es necesario investigar distintas estrategias de extracción y purificación que permitan que el proceso sea económicamente viable y ambientalmente sostenible (14).

Se han explorado múltiples alternativas de recuperación con el fin de encontrar métodos más económicos para aislar y purificar el PHA. Tras la fermentación, las células bacterianas que contienen el polímero se separan del medio mediante centrifugación. Posteriormente, la extracción y purificación pueden realizarse por diversas rutas. La mayoría de los métodos existentes emplean disolventes orgánicos como acetona o cloroformo; sin embargo, un

inconveniente importante de la extracción directa con disolventes es que la alta viscosidad de la solución de PHA dificulta la eliminación completa de la biomasa residual.

Como alternativa, se han adoptado métodos sencillos y eficaces como la lisis química mediante hipoclorito de sodio. Este procedimiento fue utilizado con éxito en *Pseudomonas putida* utilizando suero de leche como sustrato, obteniéndose resultados favorables (17).

Otro enfoque emergente corresponde a los métodos de purificación biológica, utilizados para eliminar impurezas como CO₂ y H₂S. Estos métodos están recibiendo mayor atención debido a normativas ambientales cada vez más estrictas, que exigen procesos más limpios y seguros (22).

Debe considerarse que tanto los cultivos puros como los recombinantes requieren condiciones estrictamente estériles y fuentes de carbono específicas, seguidas de etapas de recuperación y purificación altamente controladas. Esto se traduce en costos de producción que pueden ser entre cuatro y nueve veces superiores a los de los plásticos convencionales (49).

Propuestas emergentes para la optimización de la producción de PHA

A partir de la literatura analizada, se identifican dos líneas principales de investigación orientadas a mejorar la eficiencia y la viabilidad económica del proceso de producción de PHA. La primera contempla el uso de *Bacillus subtilis* en sistemas de cultivo por lotes alimentados, empleando aguas residuales como sustrato primario. Este enfoque se sustenta en el rendimiento reportado para *B. subtilis* (10) y en la elevada carga orgánica de las aguas residuales, las cuales representan una fuente accesible y de bajo costo. Para garantizar la disponibilidad de carbono, diversos autores sugieren el uso de glucosa suplementaria como medida preventiva ante posibles deficiencias.

La segunda línea corresponde a estrategias basadas en cultivos mixtos, mediante la conformación de consorcios microbianos integrados por especies con altas tasas de acumulación de PHA, como *Azotobacter vinelandii*, *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas oleovorans*. La combinación de microorganismos con fisiologías complementarias podría favorecer la estabilidad metabólica del sistema y mejorar la eficiencia global del proceso. En los estudios revisados, este tipo de consorcios ha mostrado un mejor desempeño cuando se emplean aguas residuales suplementadas con NaCl al 1% (p/v). Asimismo, se destaca que *A. vinelandii* presenta un perfil nutricional distinto al de las otras especies, lo cual podría reducir la competencia intra-consorcio.

La literatura también enfatiza la influencia determinante de variables operacionales como el pH, la velocidad de agitación, el tipo de soporte, el diseño del biorreactor y las condiciones de oxigenación. La evaluación sistemática de estos factores se ha visto facilitada por herramientas estadísticas como los diseños de Plackett–Burman, ampliamente utilizados en la optimización de procesos biotecnológicos.

Aunque el tipo de biorreactor no fue discutido en profundidad en los estudios considerados, sí se reconoce su impacto directo en los costos de producción. En particular, se ha señalado que la fermentación en estado sólido puede reducir los costos de fabricación debido a la menor necesidad de etapas complejas de recuperación (downstream) y a su capacidad para trabajar con concentraciones más elevadas de sustrato. Esta modalidad también permite reducir el

volumen de los reactores y aprovechar la ventilación natural a través de los espacios interpartículas (8).

Finalmente, numerosos autores coinciden en la necesidad de incrementar los esfuerzos orientados a mejorar tanto la eficiencia del proceso como su viabilidad económica, con el fin de ampliar la producción y las aplicaciones industriales de los PHA (50). En este contexto, las herramientas de ingeniería genética emergen como una alternativa prometedora, ya que permiten modificar o diseñar genes en bacterias, hongos y microalgas para incrementar su capacidad natural de acumulación de PHA, tomando como referencia los microorganismos con mejores rendimientos.

Conclusión

La revisión realizada evidencia un volumen considerable de estudios orientados a identificar las condiciones que optimizan la producción de polihidroxialcanoatos (PHA), así como sus posibles rutas de valorización. Los resultados reportados confirman el creciente interés industrial por estos biopolímeros, cuya aplicación se ha extendido a sectores como la industria farmacéutica (suplementos), biomédica (dispositivos sanitarios y reparación de tejidos) y alimentaria (empaques), entre otros.

En relación con los insumos y configuraciones de cultivo, se observa que los sustratos puros continúan siendo los más utilizados (30%), seguidos por las aguas residuales (25%). Asimismo, los cultivos axénicos representan la mayoría de los casos analizados (54,5%), lo cual se atribuye a sus elevados porcentajes de acumulación de PHA. Entre los microorganismos empleados, las bacterias destacan ampliamente (65%), reflejando su robustez metabólica, facilidad de manipulación y disponibilidad de información genética.

A partir del análisis comparativo de los estudios, se identifican dos estrategias con potencial para el mejoramiento de la producción de PHA. La primera consiste en el uso de *Bacillus subtilis* bajo un esquema de lotes alimentados, empleando aguas residuales como fuente de carbono y suplementándolas con glucosa para asegurar la disponibilidad del sustrato. La segunda estrategia contempla el establecimiento de un cultivo mixto integrado por *Azotobacter vinelandii*, *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas oleovorans*, utilizando efluente industrial textil enriquecido con hidrolizado de madera. Ambas alternativas buscan equilibrar la eficiencia del proceso con la reducción de costos mediante el aprovechamiento de corrientes residuales y el uso de microorganismos con elevada capacidad de acumulación de PHA.

Financiamiento

Esta revisión de literatura fue presentada como trabajo de grado para optar por el título de microbiología industrial. No se recibió financiamiento por la escritura de este artículo de revisión.

Conflicto de interés

La autora declara que no existen conflictos de interés.

Disponibilidad de datos

No se crearon datos a partir de esta investigación.

Referencias

1. Dent, M. (2020). *Bioplastics 2020–2025*. IDTechEx. <https://www.idtechex.com/en/research-report/bioplastics-2020-2025/721>
2. González García, Y., Meza Contreras, J., González Reynoso, O., & Córdova López, J. (2012). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 85–100. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007
3. Brown, B., Immethun, C., Alsiyabi, A., Long, D., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). Heterologous PHA in expression in *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 for bioplastic production from lignocellulosic biomass. *Metabolic Engineering Communications*, 14, e00191. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00191>
4. Matos, M., Cruz, R. A. P., Cardoso, P., Silva, F., Freitas, E. B., Carvalho, G., et al. (2021). Sludge retention time impacts on polyhydroxyalkanoate productivity in uncoupled storage/growth processes. *Science of the Total Environment*, 799, 149363. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149363>
5. Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., et al. (2021). Haloarchaea as cell factories to produce bioplastics. *Marine Drugs*, 19(3), 159. <https://doi.org/10.3390/md19030159>
6. Pagliano, G., Ventorino, V., Panico, A., & Pepe, O. (2017). Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: A review of microbial processes. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 113. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0791-8>
7. De Donno Novelli, L., Moreno Sayavedra, S., & Rene, E. R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology*, 331, 124985. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124985>
8. Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2), 30. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
9. Duvigneau, S., Dürr, R., Wulkow, M., & Kienle, A. (2022). Multiscale modeling of the microbial production of polyhydroxyalkanoates using two carbon sources. *Computers & Chemical Engineering*, 160, 107694. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2021.107694>
10. Gomaa, E. Z. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 145–154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100018>
11. Chang, H. M., Wang, Z. H., Luo, H. N., Xu, M., Ren, X. Y., Zheng, G. X., et al. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(6). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143930>
12. Al-Battashi, H., & Sivakumar, N. (2022). High-solid loading enzymatic hydrolysis of waste office paper for poly-3-hydroxybutyrate production through simultaneous

- saccharification and fermentation. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02392-7>
13. Mohidin Batcha, A. F., Prasad, D. M. R., Khan, M. R., & Abdullah, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(5), 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1009-5>
 14. Priyadarshini, R., Chandra, R., Bala, K., Samadhiya, K., Sangtani, R., & Nogueira, R. (2022). Insightful advancement and opportunities for microbial bioplastic production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 674864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.674864>
 15. Dietrich, K., Oliveira-Filho, E. R., Dumont, M. J., Gomez, J. G. C., Taciro, M. K., Silva, L. F., et al. (2020). Increasing PHB production with an industrially scalable hardwood hydrolysate as a carbon source. *Industrial Crops and Products*, 154, 112703. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112703>
 16. Oliveira, C. S. S., Silva, M. O. D., Silva, C. E., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2018). Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrient source for low-cost mixed microbial PHA production. *Applied Sciences*, 8(12), 2474. <https://doi.org/10.3390/app8122474>
 17. Sathya, P. S., Bose, A., Raja, S., Jeyaram, K., Arockiasamy, S., & Velmurugan, S. (2013). Investigation of fermentation condition for production enhancement of polyhydroxyalkanoate from cheese whey. *Journal of Scientific & Industrial Research*. <http://www.niscpr.res.in>
 18. Raho, S., Carofiglio, V. E., Montemurro, M., Miceli, V., Centrone, D., Stufano, P., et al. (2020). Production of the polyhydroxyalkanoate PHBV from ricotta cheese exhausted whey by *Haloferax mediterranei* fermentation. *Foods*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/foods9040469>
 19. Fradinho, J., Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., Reis, M. A. M., & Puyol, D. (2021). Up-scale challenges on biopolymer production from waste streams by purple phototrophic bacteria mixed cultures: A critical review. *Bioresource Technology*, 327, 124789. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124789>
 20. García, C., Alcaraz, W., Acosta-Cárdenas, A., & Ochoa, S. (2019). Application of process system engineering tools to the fed-batch production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a vinasses–molasses mixture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 1023–1037. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02102-z>
 21. Dobroth, Z. T., Hu, S., Coats, E. R., & McDonald, A. G. (2011). Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource Technology*, 102(3), 3352–3359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.031>
 22. Tsapekos, P., Khoshnevisan, B., Alvarado-Morales, M., Zhu, X., Pan, J., Tian, H., et al. (2021). Upcycling the anaerobic digestion streams in a bioeconomy approach: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111563>
 23. Wang, B., Xiong, W., Yu, J., Maness, P.-C., & Meldrum, D. R. (2018). Unlocking the photobiological conversion of CO₂ to (R)-3-hydroxybutyrate in cyanobacteria. *Green Chemistry*, 20(16), 3772–3782. <https://doi.org/10.1039/C8GC01208C>
 24. Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., et al. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99(13), 5444–5451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.006>
 25. Steinbüchel, A., Debzi, E. M., Marchessault, R. H., & Timm, A. (1993). Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium*

- violaceum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 443–449. <https://doi.org/10.1007/BF00205030>
26. Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., & Singh, R. P. (2013). Statistical optimization of physical process variables for bioplastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. *Biomass and Bioenergy*, 55, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.021>
27. Alsafadi, D., & Al-Mashaqbeh, O. (2017). A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.002>
28. Yuan, Q., Sparling, R., & Oleszkiewicz, J. (2015). Polyhydroxybutyrate production from municipal wastewater activated sludge with different carbon sources. *Air, Soil and Water Research*, 8, 53–58. <https://doi.org/10.4137/ASWR.S27218>
29. Arias, D. M., García, J., & Uggetti, E. (2020). Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives. *New Biotechnology*, 55, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.03.001>
30. Ben, M., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2016). Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(11), 2817–2826. <https://doi.org/10.1002/jctb.4891>
31. Karaca, S., Yagci, N., & Randall, C. W. (2019). Polyhydroxyalkanoate production using enriched biomass and acidogenic fermentation products of dairy wastewater and organic food waste. *Desalination and Water Treatment*. <https://www.deswater.com>
32. Pedrouso, A., Fra-Vázquez, A., del Río, A. V., & Mosquera-Corral, A. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates from cooked mussel processing wastewater at high salinity and acidic conditions. *Sustainability*, 12(24), 10386. <https://doi.org/10.3390/su122410386>
33. Wang, Y., & Liu, S. (2014). Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates. *AMB Express*, 4, 44. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0044-0>
34. Amulya, K., Reddy, M. V., Rohit, M. V., & Mohan, S. V. (2016). Wastewater as renewable feedstock for bioplastics production. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4618–4627. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.11.071>
35. Kongpeng, C., Iewkittayakorn, J., & Chotigeat, W. (2017). Effect of storage time and concentration of used cooking oil on polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus necator* H16. *Sains Malaysiana*, 46(9), 1465–1469. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2017-4609-15>
36. Wang, Y., Dao, J., & Chen, G.-Q. (2019). Polyhydroxyalkanoate/polyhydroxybutyrate. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 244–257). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818547-3.00037-9>
37. Guancha, M. A., Realpe-Delgado, M. E., & García-Celis, J. (2022). Obtención de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: Un estudio de revisión. *Informador Técnico*, 86(1), 111–135. https://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/665
38. Aramvash, A., Moazzeni Zavareh, F., & Gholami Banadkuki, N. (2018). Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700102>
39. Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.001>
40. Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bioplastics. *Algal Research*, 2(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.006>

41. Heidorn, T., Camsund, D., Huang, H.-H., Lindberg, P., Oliveira, P., Stensjö, K., et al. (2011). Synthetic biology in cyanobacteria: Engineering and analyzing novel functions. *Methods in Enzymology*, 497, 539–579. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385933-9.00026-9>
42. Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J., & Ruiz-Berraquero, F. (1986). Accumulation of poly(β -hydroxybutyrate) by halobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(1), 214–216. <https://doi.org/10.1128/aem.51.1.214-216.1986>
43. Yield10 Bioscience, Inc. (2022). *Yield10 Bioscience announces achievement of proof-of-concept milestone for producing PHA bioplastic in field grown camelina plants*. <https://yield10bioscienceinc.gcs-web.com>
44. Jari, M., Khatami, S. R., Galehdari, H., & Shafiei, M. (2015). Cloning and expression of poly 3-hydroxybutyrate operon into *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), e16654. <https://doi.org/10.5812/jjm.16654>
45. Aguillón, L. (2018). *Estudio de los procesos de pirolisis-gasificación de residuos agrícolas del cultivo de henequén* (Tesis de maestría). CICY. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx>
46. Moita Fidalgo, R., Ortigueira, J., Freches, A., Pelica, J., Gonçalves, M., Mendes, B., et al. (2014). Bio-oil upgrading strategies to improve PHA production from selected aerobic mixed cultures. *New Biotechnology*, 31(4), 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.009>
47. Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.028>
48. Agnew, D. E., Stevermer, A. K., Youngquist, J. T., & Pfleger, B. F. (2012). Engineering *Escherichia coli* for production of C12–C14 polyhydroxyalkanoate from glucose. *Metabolic Engineering*, 14(6), 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.06.004>
49. Moretto, G., Lorini, L., Pavan, P., Crognale, S., Tonanzi, B., Rossetti, S., et al. (2020). Biopolymers from urban organic waste: Influence of the solid retention time to cycle length ratio in the enrichment of a mixed microbial culture. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(38), 14404–14415. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c04980>
50. Chien Bong, C. P., Alam, M. N. H. Z., Samsudin, S. A., Jamaluddin, J., Adrus, N., Mohd Yusof, A. H., et al. (2021). A review on the potential of polyhydroxyalkanoates production from oil-based substrates. *Journal of Environmental Management*, 298, 113461. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113461>